

09/890549

## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

REC'D 28 JUN 2001

PCT

14

Applicant's or agent's file reference PF-0676PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/US00/04160	International filing date (day/month/year) 18 FEBRUARY 2000	Priority date (day/month/year) 19 FEBRUARY 1999
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC Please See Supplemental Sheet.		
Applicant INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

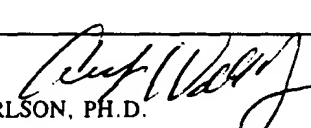
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority. (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 0 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of report with regard to novelty, inventive step or industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 31 AUGUST 2000	Date of completion of this report 05 JUNE 2001
Name and mailing address of the IPEA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231	Authorized officer KAREN COCHRANE CARLSON, PH.D. 
Facsimile No (703) 305-3230	Telephone No (703) 305-3230



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/US00/04160

**I. Basis of the report****1. With regard to the elements of the international application:\***

- ☒ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
pages 1-67, as originally filed  
pages NONE, filed with the demand  
pages NONE, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
pages 68-71, as originally filed  
pages NONE, as amended (together with any statement) under Article 19  
pages NONE, filed with the demand  
pages NONE, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the drawings:  
pages NONE, as originally filed  
pages NONE, filed with the demand  
pages NONE, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the sequence listing part of the description:  
pages 1-21, as originally filed  
pages NONE, filed with the demand  
pages NONE, filed with the letter of \_\_\_\_\_

**2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.**

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3).

**3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:**

- ☒ contained in the international application in printed form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

**4. ☒ The amendments have resulted in the cancellation of:**

- ☒ the description, pages NONE
- ☒ the claims, Nos. NONE
- ☒ the drawings, sheets/fig NONE

**5. ☐ This report has been drawn as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\***

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17).



INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/US00/04160

**III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been and will not be examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 18, 19, 21, 22

because:

☐ the said international application, or the said claim Nos. \_ relate to the following subject matter which does not require international preliminary examination (*specify*).

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*).

☐ the claims, or said claims Nos. \_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

☒ no international search report has been established for said claims Nos. (See Attached).

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/US00/04160

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. statement**

Novelty (N)	Claims <u>1-17, 20, 23 in part</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
Inventive Step (IS)	Claims <u>1-17, 20, 23 in part</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO
Industrial Applicability (IA)	Claims <u>1-17, 20, 23 in part</u>	YES
	Claims <u>NONE</u>	NO

**2. citations and explanations (Rule 70.7)**

Claims 1-17, 20, and 23 examined in part meet the criteria set out in PCT Article 33(2)-(4), because the prior art does not teach or fairly suggest the claimed invention. While the European Search Authority has cited art that may anticipate or render obvious the claimed invention, there is no indication in the search report as to how or what parts of the claims are anticipated or rendered obvious.

----- NEW CITATIONS -----

NONE





INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/US00/04160

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: Boxes I - VIII

Sheet 10

**CLASSIFICATION:**

The International Patent Classification (IPC) and/or the National classification are as listed below:

IPC(7): C12N 15/12, 15/63; C07K 16/18; C12Q 1/68; A61K 38/17; A01K 67/27 and US Cl.: 435/69.1, 320.1, 252.3, 325, 7.1; 530/350, 387.1

**III. NON-ESTABLISHMENT OF REPORT:**

No international search report has been established for claim numbers 18, 19, 21, 22, and 1-17, 20, and 23 in part .



## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference <b>PF-0676PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Notification of Transmittal of International Search Report (Form PCT/ISA/220) as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. <b>PCT/US 00/ 04160</b>	International filing date (day/month/year) <b>18/02/2000</b>	(Earliest) Priority Date (day/month/year) <b>19/02/1999</b>
Applicant  <b>INCYTE PHARMACEUTICALS, INC.</b>		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 7 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

**1. Basis of the report**

- a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ the international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of the sequence listing :

☒ contained in the international application in written form.

☒ filed together with the international application in computer readable form.

☐ furnished subsequently to this Authority in written form.

☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.

☐ the statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.

☐ the statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished

2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box I).

3. ☒ **Unity of invention is lacking** (see Box II).

**4. With regard to the title,**

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

**5. With regard to the abstract,**

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box III. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

**6. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No.**

☐ as suggested by the applicant.

☐ because the applicant failed to suggest a figure.

☐ because this figure better characterizes the invention.

☐ None of the figures.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/04160

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C07K14/47 C12N15/63 C12N5/10 A01K67/027  
 C07K16/18 C12Q1/68 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NAGASE ET AL: "PREDICTION OF THE CODING SEQUENCES OF UNIDENTIFIED HUMAN GENES. XI.THE COMPLETE SEQUENCES OF 100 NEW CDNA CLONES FROM BRAIN WHICH CODEFOR LARGE PROTEINS IN VITRO" DNA RESEARCH, vol. 5, 1998, pages 277-286, XP002926060 ISSN: 1340-2838	1-4,10, 11
Y	Table 1 right column, line 12 abstract	1-17,20, 23
X	-& KOTANI ET AL.: "Homo sapiens mRNA for KIAA0772 protein, complete cds." EMBL SEQUENCE DATABASE, 17 November 1998 (1998-11-17), XP002144842 HEIDELBERG DE Ac AB018315 the whole document	1-4,10, 11
T	-& KOTANI ET AL.: "KIAA0772 protein" EMBL SEQUENCE DATABASE, -/--	1-4,10, 11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 August 2000

Date of mailing of the international search report

23. 11. 00

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

CEDER 0.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US 00/04160

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	1 November 1999 (1999-11-01), XP002144843 HEIDELBERG DE Ac Q9Y4B8 the whole document ---	
Y	CA 2 200 794 A (UNIV TORONTO) 24 September 1998 (1998-09-24) page 4, line 1 -page 11, line 28 ---	1-17,20, 23
A	US 5 472 858 A (ATTIE ALAN D ET AL) 5 December 1995 (1995-12-05) abstract column 2, line 38 - line 50 column 2, line 65 - line 66 ---	5-8,15, 16
E	WO 00 09688 A (OHARA OSAMU ;NAGASE TAKAHIRO (JP); NOMURA NOBUO (JP); TOYODA HITOS) 24 February 2000 (2000-02-24) Seq Id Nos 1, 2 ,3 abstract ---	1-17,20, 23
E	-& DATABASE WPI Week 200019 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 2000-224333 XP002144844, 24 February 2000 (2000-02-24) abstract -----	1-17,20, 23





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 00/04160

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: -  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☒ Claims Nos.: 18-19 21-22  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:  
1-23 all partly

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## 1. Claims: 1-23 all partly

Isolated polypeptide and nucleic acid sequences selected from the groups as defined in claims 1, 3 and 10 and their uses, where the sequences are SEQ ID NO 2 and 14.

## 2. Claims: 1-23 all partly

Isolated polypeptide and nucleic acid sequences selected from the groups as defined in claims 1, 3 and 10 and their uses, where the sequences are SEQ ID NO 3 and 15.

## 3. Claims: 1-23 all partly

Isolated polypeptide and nucleic acid sequences selected from the groups as defined in claims 1, 3 and 10 and their uses, where the sequences are SEQ ID NO 4 and 16.

## 4. Claims: 1-23 all partly

Isolated polypeptide and nucleic acid sequences selected from the groups as defined in claims 1, 3 and 10 and their uses, where the sequences are SEQ ID NO 6 and 18.

## 5. Claims: 1-23 all partly

Isolated polypeptide and nucleic acid sequences selected from the groups as defined in claims 1, 3 and 10 and their uses, where the sequences are SEQ ID NO 9 and 21.

## 6. Claims: 1-23 all partly

Isolated polypeptide and nucleic acid sequences selected from the groups as defined in claims 1, 3 and 10 and their uses, where the sequences are SEQ ID NO 10 and 22.

## 7. Claims: 1-23 all partly

Isolated polypeptide and nucleic acid sequences selected from the groups as defined in claims 1, 3 and 10 and their uses, where the sequences are SEQ ID NO 11 and 23.

## 8. Claims: 1-23 all partly

Isolated polypeptide and nucleic acid sequences selected from the groups as defined in claims 1, 3 and 10 and their uses, where the sequences are SEQ ID NO 12 and 24.



FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

9. Claims: 1-23 all partly

Isolated nucleic acid sequence selected from the groups as defined in claims 3 and 10 and its use, where the sequence is SEQ ID NO 13.



## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box I.1

Although claim 16 is directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

-----

## Continuation of Box I.1

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy

-----

## Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 18-19 21-22

Claims 18, 19, 21 22 refer to agonists/antagonists of the polypeptide of claim 1, identified by the methods of claims 17 and 20, respectively, without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are specifically defined in the description. It is only indicated that they could be "proteins, antibodies, carbohydrates, small molecules, or any other compound or composition which modulates the activity of LIPAP" (page 8 line 1-2 and page 9 line 1-2). In consequence the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject-matter is not sufficiently disclosed and supported (Art 5 and 6 PCT). No search can be carried out for such claims whose wordings is, in fact, a mere recitation of the results to be achieved.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.





# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 00/04160

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CA 2200794	A	24-09-1998	NONE	
US 5472858	A	05-12-1995	NONE	
WO 0009688	A	24-02-2000	JP 2000050878 A	22-02-2000
			AU 5196799 A	06-03-2000





PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 C12N 15/12, C07K 14/47</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/09688</p> <p>(43) 国際公開日 2000年2月24日(24.02.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04353</p> <p>(22) 国際出願日 1999年8月11日(11.08.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/227718 1998年8月12日(12.08.98)</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所 (KAZUSA DNA RESEARCH INSTITUTE FOUNDATION)[JP/JP] 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番3号 Chiba, (JP) 大正製薬株式会社 (TAISHO PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてののみ) 小原 収(OHARA, Osamu)[JP/JP] 長瀬隆弘(NAGASE, Takahiro)[JP/JP] 野村信夫(NOMURA, Nobuo)[JP/JP] 〒292-0812 千葉県木更津市矢那1532番3号 財団法人 かずさディー・エヌ・エー研究所内 Chiba, (JP)</p>	<p>高山喜好(TAKAYAMA, Kiyoshi)[JP/JP] 豊田 均(Toyoda, Hitoshi)[JP/JP] 吉本 真(YOSHIMOTO, Makoto)[JP/JP] 〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社内 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 北川富造(KITAGAWA, Tomizo) 〒170-8633 東京都豊島区高田3丁目24番1号 大正製薬株式会社 特許部 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AU, CA, CN, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54) Title: NOVEL GENE AND PROTEIN OSBH ENCODED THEREBY

(54) 発明の名称 新規遺伝子及びそれにコードされる蛋白質OSBH

(57) Abstract

To provide a novel protein having an activity of binding to oxysterol. A gene osbh which encodes a novel protein OSBH having an activity of binding to oxysterol is obtained by cloning from a human brain-derived cDNA library. By culturing a transformant constructed by using an expression vector containing the above gene, OSBH can be obtained. This protein is usable as an OS-binding protein in drugs or for developing drugs.

```

0001      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
0002      110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
0003      210      220      230      240      250      260      270      280      290      300
0004      310      320      330      340      350      360      370      380      390      400
0005      410      420      430      440      450      460      470      480      490      500
0006      510      520      530      540      550      560      570      580      590      600
0007      610      620      630      640      650      660      670      680      690      700
0008      710      720      730      740      750      760      770      780      790      800
0009      810      820      830      840      850      860      870      880      890      900
0010      910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
0011      1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100
0012      1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
0013      1210     1220     1230     1240     1250     1260     1270     1280     1290     1300
0014      1310     1320     1330     1340     1350     1360     1370     1380     1390     1400
0015      1410     1420     1430     1440     1450     1460     1470     1480     1490     1500
0016      1510     1520     1530     1540     1550     1560     1570     1580     1590     1600
0017      1610     1620     1630     1640     1650     1660     1670     1680     1690     1700
0018      1710     1720     1730     1740     1750     1760     1770     1780     1790     1800
0019      1810     1820     1830     1840     1850     1860     1870     1880     1890     1900
0020      1910     1920     1930     1940     1950     1960     1970     1980     1990     2000
0021      2010     2020     2030     2040     2050     2060     2070     2080     2090     2100
0022      2110     2120     2130     2140     2150     2160     2170     2180     2190     2200
0023      2210     2220     2230     2240     2250     2260     2270     2280     2290     2300
0024      2310     2320     2330     2340     2350     2360     2370     2380     2390     2400
0025      2410     2420     2430     2440     2450     2460     2470     2480     2490     2500
0026      2510     2520     2530     2540     2550     2560     2570     2580     2590     2600
0027      2610     2620     2630     2640     2650     2660     2670     2680     2690     2700
0028      2710     2720     2730     2740     2750     2760     2770     2780     2790     2800
0029      2810     2820     2830     2840     2850     2860     2870     2880     2890     2900
0030      2910     2920     2930     2940     2950     2960     2970     2980     2990     3000
0031      3010     3020     3030     3040     3050     3060     3070     3080     3090     3100
0032      3110     3120     3130     3140     3150     3160     3170     3180     3190     3200
0033      3210     3220     3230     3240     3250     3260     3270     3280     3290     3300
0034      3310     3320     3330     3340     3350     3360     3370     3380     3390     3400
0035      3410     3420     3430     3440     3450     3460     3470     3480     3490     3500
0036      3510     3520     3530     3540     3550     3560     3570     3580     3590     3600
0037      3610     3620     3630     3640     3650     3660     3670     3680     3690     3700
0038      3710     3720     3730     3740     3750     3760     3770     3780     3790     3800
0039      3810     3820     3830     3840     3850     3860     3870     3880     3890     3900
0040      3910     3920     3930     3940     3950     3960     3970     3980     3990     4000
0041      4010     4020     4030     4040     4050     4060     4070     4080     4090     4100
0042      4110     4120     4130     4140     4150     4160     4170     4180     4190     4200
0043      4210     4220     4230     4240     4250     4260     4270     4280     4290     4300
0044      4310     4320     4330     4340     4350     4360     4370     4380     4390     4400
0045      4410     4420     4430     4440     4450     4460     4470     4480     4490     4500
0046      4510     4520     4530     4540     4550     4560     4570     4580     4590     4600
0047      4610     4620     4630     4640     4650     4660     4670     4680     4690     4700
0048      4710     4720     4730     4740     4750     4760     4770     4780     4790     4800
0049      4810     4820     4830     4840     4850     4860     4870     4880     4890     4900
0050      4910     4920     4930     4940     4950     4960     4970     4980     4990     5000
0051      5010     5020     5030     5040     5050     5060     5070     5080     5090     5100
0052      5110     5120     5130     5140     5150     5160     5170     5180     5190     5200
0053      5210     5220     5230     5240     5250     5260     5270     5280     5290     5300
0054      5310     5320     5330     5340     5350     5360     5370     5380     5390     5400
0055      5410     5420     5430     5440     5450     5460     5470     5480     5490     5500
0056      5510     5520     5530     5540     5550     5560     5570     5580     5590     5600
0057      5610     5620     5630     5640     5650     5660     5670     5680     5690     5700
0058      5710     5720     5730     5740     5750     5760     5770     5780     5790     5800
0059      5810     5820     5830     5840     5850     5860     5870     5880     5890     5900
0060      5910     5920     5930     5940     5950     5960     5970     5980     5990     6000
0061      6010     6020     6030     6040     6050     6060     6070     6080     6090     6100
0062      6110     6120     6130     6140     6150     6160     6170     6180     6190     6200
0063      6210     6220     6230     6240     6250     6260     6270     6280     6290     6300
0064      6310     6320     6330     6340     6350     6360     6370     6380     6390     6400
0065      6410     6420     6430     6440     6450     6460     6470     6480     6490     6500
0066      6510     6520     6530     6540     6550     6560     6570     6580     6590     6600
0067      6610     6620     6630     6640     6650     6660     6670     6680     6690     6700
0068      6710     6720     6730     6740     6750     6760     6770     6780     6790     6800
0069      6810     6820     6830     6840     6850     6860     6870     6880     6890     6900
0070      6910     6920     6930     6940     6950     6960     6970     6980     6990     7000
0071      7010     7020     7030     7040     7050     7060     7070     7080     7090     7100
0072      7110     7120     7130     7140     7150     7160     7170     7180     7190     7200
0073      7210     7220     7230     7240     7250     7260     7270     7280     7290     7300
0074      7310     7320     7330     7340     7350     7360     7370     7380     7390     7400
0075      7410     7420     7430     7440     7450     7460     7470     7480     7490     7500
0076      7510     7520     7530     7540     7550     7560     7570     7580     7590     7600
0077      7610     7620     7630     7640     7650     7660     7670     7680     7690     7700
0078      7710     7720     7730     7740     7750     7760     7770     7780     7790     7800
0079      7810     7820     7830     7840     7850     7860     7870     7880     7890     7900
0080      7910     7920     7930     7940     7950     7960     7970     7980     7990     8000
0081      8010     8020     8030     8040     8050     8060     8070     8080     8090     8100
0082      8110     8120     8130     8140     8150     8160     8170     8180     8190     8200
0083      8210     8220     8230     8240     8250     8260     8270     8280     8290     8300
0084      8310     8320     8330     8340     8350     8360     8370     8380     8390     8400
0085      8410     8420     8430     8440     8450     8460     8470     8480     8490     8500
0086      8510     8520     8530     8540     8550     8560     8570     8580     8590     8600
0087      8610     8620     8630     8640     8650     8660     8670     8680     8690     8700
0088      8710     8720     8730     8740     8750     8760     8770     8780     8790     8800
0089      8810     8820     8830     8840     8850     8860     8870     8880     8890     8900
0090      8910     8920     8930     8940     8950     8960     8970     8980     8990     9000
0091      9010     9020     9030     9040     9050     9060     9070     9080     9090     9100
0092      9110     9120     9130     9140     9150     9160     9170     9180     9190     9200
0093      9210     9220     9230     9240     9250     9260     9270     9280     9290     9300
0094      9310     9320     9330     9340     9350     9360     9370     9380     9390     9400
0095      9410     9420     9430     9440     9450     9460     9470     9480     9490     9500
0096      9510     9520     9530     9540     9550     9560     9570     9580     9590     9600
0097      9610     9620     9630     9640     9650     9660     9670     9680     9690     9700
0098      9710     9720     9730     9740     9750     9760     9770     9780     9790     9800
0099      9810     9820     9830     9840     9850     9860     9870     9880     9890     9900
0100     9910     9920     9930     9940     9950     9960     9970     9980     9990     10000

```

## 目的

オキシステロールとの結合活性を有する新規蛋白質を提供する。

## 構成

ヒト脳由来の c DNA ライブラリーからのクローニングによって、オキシステロール結合活性を有する新規蛋白質 O S B H をコードする遺伝子 o s b h が得られ、該遺伝子を有する発現ベクターによる形質転換体の培養により、O S B H が得られる。該蛋白質は O S 結合蛋白質として、医薬又は医薬の開発に用いることができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
		KG	キルギスタン				

## 明 細 書

## 新規遺伝子及びそれにコードされる蛋白質OSBH

## 技術分野

本発明は、オキシステロール結合活性を有する、脳由来の新規蛋白質OSBH、該蛋白質をコードする遺伝子osbhに関するものである。

## 背景技術

心筋梗塞、脳梗塞の主要な原因は、粥状の硬化巣が動脈壁に形成されることによる血管の閉塞である。この動脈硬化発症の初期段階では、変成したLDL（低密度リポ蛋白質）が重要な働きをする。すなわち、正常LDLが血管内皮下に浸潤して酸化あるいは糖化され変成LDLとなると、単球は血流より浸潤してマクロファージに分化してこれら変成LDLを貪食し、その細胞内に脂質をため込みいわゆる泡沫化する。このマクロファージの泡沫化が動脈硬化発症の引き金となる。

酸化による変性LDL中には様々な酸化脂質が含まれる。特にコレステロールが酸化したオキシステロール（以下OS）は多彩な生理活性を有し、動脈硬化進展に影響を与える。OSは、マクロファージや血管平滑筋細胞に対しアポトーシスを誘導し、不安定な硬化巣を形成する。また、acyl-CoA :Cholesterol acyltransferase (ACAT)を活性化することにより、コレステロールの細胞内の蓄積を促進させ、コレステロールの細胞外への放出を阻害する。

OSは脂溶性が高いために細胞内では遊離状態で存在出来ず、特別な蛋白質と結合してその生理活性を発現している。これまでに、この結合活性を有する蛋白質として、OS結合蛋白質（OxySterol Binding Protein、以下OSBPとする）が報告されている。

しかし、このOSBPはOSの有する全ての生理活性の発現に関与するものではなく、OSBP以外のOS結合性蛋白質の存在も含め、OSの詳細な機能発現機構に関しては不明な点が多い。そのため、OSBPとは異なる分子であって、OSとの結合能を有し、OSの多彩な生理活性発現に関わる新たな分子を明らか

にすることにより、かかる生体分子を直接的に医薬として使用し、又は間接的に医薬化合物の探索に供することが可能となると推察される。

本発明は、この様な分子を同定し、医薬等または医薬等の開発に利用することにある。

## 発明の開示

本発明者らは、ヒト全脳で発現している遺伝子の中から、所望の蛋白質を把握するべく鋭意研究の結果、新規蛋白質OSBH (OxySterol Binding protein Homolog)の存在と、これをコードする遺伝子osbhの単離に成功し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、(a) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質、または(b) 配列番号：1のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつOS結合活性を有する蛋白質に関するものである。さらに本発明は、(c) 配列番号：2に記載のDNAからなる遺伝子、または、(d) 配列番号：2のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつOS結合活性を有する蛋白質をコードするDNAからなる遺伝子に関するものである。

本発明の遺伝子であるosbhは、ヒト脳由来のcDNAライブラリーから、該遺伝子を含んだcDNA断片として単離することができる。本発明者らが使用したcDNAライブラリーは、クローンテック社から市販されているヒト脳から抽出したmRNAをもとに調製したものである

上述のcDNAライブラリーにおいて、OS結合活性を有する蛋白質をコードするcDNAを識別する方法として、小原らの方法(DNA Research, Vol. 4, p53, 1997)による、長鎖cDNAライブラリーを用いた網羅的cDNAライブラリーの解析を用いた。小原らの方法で作製した、ヒト脳由来の長鎖cDNAライブラリーから無作為に25,000個の組換え体を選択し、15,000クローンのcDNA部分の5'側ならびに3'側の塩基配列を決定し、全クローンの5'側の配列から既に報告されているOSBPをコードする遺伝子と相同性のあるクローンを、DNA解析プログラム(BLAST並びにFastA)を用いることで見出す事が

出来る。

塩基配列中の蛋白質をコードする領域 (ORF、open reading frame) の存在は、塩基配列をコンピュタープログラムを用いて解析する汎用の方法により確認することができる。該 cDNA 配列の中に目的とする遺伝子の存在を確信した本発明者らは、コンピュターを利用して該配列中に一つの ORF を見だし、この遺伝子を *osbh*、該遺伝子にコードされる蛋白質を OSBH と命名した。本発明である OSBH は、全 468 アミノ酸残基からなる分子量約 50 キロダルトン (kDa) の蛋白質である。

*osbh* は、配列番号：2 に示される塩基対 1407 残基からなる遺伝子である。この *osbh* を用い、適当な宿主ベクター系による一般的な遺伝子組み換え技術によって、組み換え遺伝子を調製することができる。適当なベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322、pUC118 その他)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110、pC194 その他)、酵母由来のプラスミド (例、pSH19 その他)、さらにバクテリオファージやレトロウィルスやワクシニアウィルス等の動物ウィルス等が利用できる。組み換えに際しては、適当な合成 DNA アダプターを用いて翻訳開始コドンや翻訳終止コドンを付加することも可能である。さらに該遺伝子を発現させるために、遺伝子の上流に適当な発現プロモーターを接続する。使用するプロモーターは、宿主に応じて適宜選択すればよい。例えば、宿主が大腸菌である場合には、T7 プロモーター、*lac* プロモーター、*trp* プロモーター、 $\lambda$  PL プロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合には SPO 系プロモーター等が、宿主が酵母である場合には PHO5 プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター等が、宿主が動物細胞である場合には SV40 由来プロモーター、レトロウィルスプロモーター等が、それぞれ使用できる。

また該遺伝子を他の蛋白質 (例、グルタチオン S トランスフェラーゼ、プロテイン A その他) との融合蛋白質として発現させることも可能である。このようにして発現させた融合型 OSBH は、適当なプロテアーゼ (例、トロンビンその他) を用いて切り出すことが可能である。

OSBH の発現の際に利用できる宿主としては、エシェリヒア属菌である Esch

erichia coliの各種菌株、バチルス属菌であるBacillus subtilisの各種菌株、酵母としてはSaccharomyces cerevisiaeの各種菌株、動物細胞としてはCOS-7細胞、CHO細胞等が利用できる。

上記組み換えベクターを用いて宿主細胞を形質転換する方法としては、常法または各宿主細胞に対して一般に用いられる形質転換方法が適用できる。

尚、本発明においては、配列番号：2に示したDNA配列の他に、該DNAとハイブリダイズしかつOS結合活性を有する蛋白質をコードするDNAも、本発明の範囲内である。

すなわち、osbhの全長配列において、種々の人為的処理、例えば部位特異的変異導入、変異剤処理によるランダム変異、制限酵素切断によるDNA断片の変異・欠失・連結等により、部分的にDNA配列が変化したものであっても、これらDNA変異体がosbhとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつOS結合活性を有する蛋白質をコードするDNAであれば、配列番号：2に示したDNA配列との相違に関わらず、本発明の範囲内のものである。

上記のDNA変異の程度は、osbhのDNA配列と90%以上の相同性を有するものであれば許容範囲内である。また、osbhとハイブリダイズする程度としては、通常の条件下、例えばDIG DNA Labeling kit（ベーリンガー・マンハイム社製Cat No. 1175033）でプローブをラベルした場合に、32℃のDIG Easy Hyb溶液（ベーリンガー・マンハイム社製Cat No. 1603558）中でハイブリダイズさせ、50℃の0.5×SSC溶液（0.1% [w/v] SDSを含む）中でメンブレンを洗浄する条件（1×SSCは0.15M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウムである）でのサザンハイブリダイゼーションで、osbhにハイブリダイズする程度であればよい。

また、上記のごとくosbhと相同性の高い変異体遺伝子にコードされる蛋白質であって、OS結合活性を有する蛋白質もまた、本発明の範囲内のものである。

すなわち、OSBHのアミノ酸配列の1もしくは複数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加された変異体であっても、該変異体がOS結合活性を有する蛋白質であれば、該変異体は本発明の範囲内のものである。

蛋白質の構成要素となるアミノ酸の側鎖は、疎水性、電荷、大きさなどにおい



てそれぞれ異なるものであるが、実質的に蛋白質全体の3次元構造（立体構造とも言う）に影響を与えないという意味で保存性の高い幾つかの関係が、経験的にまた物理化学的な実測により知られている。例えば、アミノ酸残基の置換については、グリシン（Gly）とプロリン（Pro）、Glyとアラニン（Ala）またはバリン（Val）、ロイシン（Leu）とイソロイシン（Ile）、グルタミン酸（Glu）とグルタミン（Gln）、アスパラギン酸（Asp）とアスパラギン（Asn）、システイン（Cys）とスレオニン（Thr）、Thrとセリン（Ser）またはAla、リジン（Lys）とアルギニン（Arg）、等が挙げられる。

従って、配列番号：1に示したOSBHのアミノ酸配列上の置換、挿入、欠失等による変異蛋白質であっても、その変異がOSBHの3次元構造において保存性が高い変異であって、その変異蛋白質がOSBHと同様にOS結合活性を有する蛋白質であれば、これらは本発明の範囲内にあるものと言うことができる。変異の程度としては、配列番号：1に示したアミノ酸配列との相同性が90%以上のものが許容し得る範囲である。

#### 産業上の利用可能性

OSBHはOS結合活性を有していることから、osbhの発現異常あるいはOSBHの機能不全は、動脈硬化進展に重大な影響を及ぼすと推測される。

従って、動脈硬化治療薬を目的として、osbhやOSBHを用いることにより、OSBHの機能と同様の機能を有する物質や当該機能を促進する物質あるいは阻害する物質、あるいは遺伝子の発現を促進或いは抑制する物質等の探索、評価を効率よく行うことができる。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下実施例を挙げて詳述するが、本発明はこの実施例に限定されないことは言うまでもない。尚、特に断らない限り、下記実施例において使用した実験操作は、Molecular Cloning 2nd. ed. (Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に代表される各種の標準的実験書や、市販キットの取扱説明書の記載、また制限酵素等の各

市販製品に対する推奨条件下で行うことができる。

#### 実施例1 o s b hのクローニング

##### 1) ヒト脳由来の長鎖cDNAライブラリーの構築

NotIサイトを有するオリゴヌクレオチド (GACTAGTTCTAGATCGCGAGCGGCCGCCC(T)<sub>15</sub>)をDNA合成機 (ABI380B) で合成した。これをプライマーとして、ヒト脳由来のmRNA (クローンテック社) を鋳型にSuperScript II逆転転写酵素キット (ギブコBRL社) で2本鎖cDNAを合成した。この2本鎖cDNAと、SalIサイトを有するアダプター (宝酒造) とをライゲーションした後NotIで消化し、1%濃度の低融解アガロース電気泳動により、3 kb以上のcDNA断片を精製した。

精製cDNA断片を、SalI-NotI制限酵素処理を施したpBluescript IISK+ プラスミドとライゲーションした。大腸菌 ElectroMax DH10B株 (ギブコBRL社) に、エレクトロポレーション法により組み換えプラスミドを導入した。

次いで、当該ライブラリーから無作為に25,000個の組換え体を選択し、組換えDNAを抽出し、15,000クローンのcDNA部分の5'側ならびに3'側の塩基配列を決定した。配列決定にはPEアプライドバイオシステムズ社製のDNAシーケンサー (ABI PRISM377) と同社製反応キットを用いた。

##### 2) o s b hの配列を含むクローンの選別

1) で決定した全クローンの5'側の配列を既に報告されているo s b pとDNA解析プログラム (BLAST並びにFastA) を用いて比較したところ、クローン名HK05119が有為な相同性を示した。

##### 3) DNA断片の塩基配列の決定

塩基配列決定にはPEアプライドバイオシステムズ社製のDNAシーケンサーを用い、ダイプライマー法を用いた。大部分の配列はショットガン法で、一部の塩基配列については、決定した塩基配列を元にしてオリゴヌクレオチドを合成し、プライマーウォーキング法で両鎖の全塩基配列を決定した。当該クローンのcDNAの全塩基配列を配列番号3に示す。

当該cDNAは468残基より成る蛋白質 (OSBH) をコードするORFを含んでいる (配列番号: 3)。該蛋白質の開始コドンであるメチオニン残基の上

流域に同じreading frameで終止コドンが出現したことから、当該cDNA断片がコードする蛋白質のアミノ酸配列は、配列番号：3に示したものが唯一のものであることが確認された。

既に報告されているOSBPと本発明であるOSBHのアミノ酸の相同性を第1図に示す。両者は高い相同性を示し、特にOSBHの162残基から172残基はOSを結合する蛋白質が共通に保有する重要な領域であると推察される。

実施例2 osbhのin vitroトランスレーション法による蛋白質発現の確認

実施例1で調製したosbhを含むプラスミドをRNaseAで処理後、ADVAMAXビーズ（AGTC社製）でRNaseAを除去して、(<sup>35</sup>S)メチオニン存在下でTNT T7 coupled reticulocyte lysateシステム（プロメガ社）を用いてin vitroトランスレーションを実施した。反応液の一部をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（SDS-PAGE）により分離して、BAS-2000（富士写真工）で解析した。その結果、第2図に示すように約50kDaの位置に主要なバンドを確認した。

実施例3 動物細胞発現用ベクターの構築

#### 1) ORFを含むcDNAの増幅

配列番号：3の該蛋白質の開始コドンより上流の配列を有するオリゴヌクレオチド（下記の配列-1）と、該蛋白質の終止コドンより下流の一部分と逆相補鎖と配列を有するオリゴヌクレオチド（下記の配列-2）をDNA合成機（ABI社製380B）で合成した。

配列-1 5'-GGCAGTGGAGGCTGGCTGCTGAAGG-3'

配列-2 5'-TCTGCTGTGACGAGGCTCACAATGG-3'

実施例1で単離した配列番号：3を含む組み換えcDNAを鋳型とし、配列-1のオリゴヌクレオチドと配列-2のオリゴヌクレオチドをプライマーとし、タカラLA PCR Kit Ver.2とPCRサーマルサイクラーMP（いずれも宝酒造製）を用いて、以下のPCR操作を行った。

cDNA	5 $\mu$ l (10ng)
10×PCRバッファー(25mM Mg <sup>++</sup> を含む)	5 $\mu$ l
2.5mM dNTP	8 $\mu$ l

10 $\mu$ M 配列-1	2 $\mu$ l
10 $\mu$ M 配列-2	2 $\mu$ l
水	27.5 $\mu$ l
LA Taq <sup>®</sup> ポリメラーゼ	0.5 $\mu$ l
総量	50 $\mu$ l

PCRサイクルは、94℃で2分保持後、98℃で20秒間反応させ、68℃まで-1℃/2秒の速度で冷却し、68℃で3分保持し、更に72℃で10分間保持を30回繰り返して行った。

上記方法により、配列番号：3の一部を有するDNA断片（約1.5kb）を増幅させた。

## 2) 動物細胞用発現ベクターへのサブクローニング

1) で増幅したDNA断片を、1%アガロースゲル電気泳動で分画した。ゲルをエチジウムブロマイドで染色した後、紫外光照射して目的とするバンドを含むゲルを切り出した。アガロースゲルからのDNA断片の抽出と精製は、GENECLEAN II Kit（バイオ101社製）を用いて行った。

この抽出精製したDNA断片を、動物細胞用発現ベクターpTARGET（プロメガ社製）にサブクローニングした。Ligation溶液はタカラDNA Ligation Kit Ver. 2（宝酒造製）を用い、以下の組成で16℃で1.5時間反応させた。

抽出精製したDNA断片	1 $\mu$ l (50ng)
pTARGET	1 $\mu$ l (10ng)
水	3 $\mu$ l
Ligation溶液	5 $\mu$ l
総量	10 $\mu$ l

上記反応後の溶液を用いて、大腸菌K12株DH5の形質転換を行った。形質転換体をアンピシリン（Amp）50  $\mu$ g/ml、5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactoside（X-gal）40  $\mu$ g/ml、Isopropyl- $\beta$ -D-Thio-Galactopyranoside（IPTG）100  $\mu$ Mを含有するLB寒天培地にプレーティングし、37℃で一晩培養した。

上記プレートに出現したコロニーを50  $\mu$ g/mlのAmpを含むLB液体培

地 10 ml に接種して 37℃で一晩培養し、遠心分離によって菌体を集めた後、QIAprep Spin Plasmid Miniprep Kit（キアゲン社製）で組換えDNAを精製し、pTARGETosbhを得た。

### 3) 導入cDNAの塩基配列の決定

塩基配列決定にはDNAシーケンサー（ABI社製PRISM377）を用い、ダイターミネーター法を用い、プライマーウオーキング法で両鎖の全塩基配列を決定した。当該クローンは配列番号：3の配列のうち、配列-1及び配列-2に挟まれるすべての領域を含んでいたことから、目的とする遺伝子pTARGETosbhがクローニングされたことを確認した。

### 実施例4 CHO k1細胞への導入と安定な形質転換体の取得

実施例2で取得したpTARGETosbhはosbh断片の上流にCMVプロモーターを有しており、当該組換えDNAを動物細胞中に導入すれば、OSBHを発現させることが可能である。

CHO k1細胞を直径60mmのプラスチックシャーレで培養した。培地としては10%牛胎児血清（大日本製薬）、50ユニット/mlペニシリン、50μg/mlストレプトマイシンを含むHamF-12（ギブコ社製、以下増殖培地とする）を使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。細胞密度が50%になった時点で、実施例-2で取得したpTARGETosbhを含むLIPOFECTAMINE試薬（ギブコ社製）を、細胞上に重層して6時間培養した後、増殖培地に置換して48時間培養した。トリプシンで細胞を分散した後、細胞懸濁液を直径60mmのプラスチックシャーレに分注してさらに24時間培養した。培地を除いた後、G418試薬（ギブコ社製；終濃度500μg/ml）を含有する増殖培地に置換した。G418試薬（B添加培地を3日毎に交換してして2週間培養した。細胞のコロニーが肉眼で確認できるようになった時点で、ステンレスカップを用いてコロニーを3個単離した。対照として用いるためにCHO k1細胞にpTARGETベクター（プロメガ社製）のみを上記と同様にして導入し、安定な形質転換体を単離した。

単離した各形質転換体を、6穴のプレートでG418添加培地（終濃度500μg/ml）で培養し、細胞密度が再度80%コンフルエントになった時点で培地を除去し、PBSを添加し洗浄後、Trizol（ギブコ社製）を用いて細胞からtotal R

NAを精製した。2  $\mu$ gの全RNA鋳型に、Superscript<sup>1</sup> 逆転転写酵素（ギブコ社製）を用いてcDNAを合成した。

合成したcDNAを鋳型に、実施例2-1）と同じオリゴヌクレオチド（配列-1、配列-2）を用いて、PCR反応を実施した。

cDNA	5 $\mu$ l (100ng)
10×PCRバッファー(25mM Mg <sup>++</sup> を含む)	5 $\mu$ l
2.5mM dNTP	8 $\mu$ l
10 $\mu$ M 配列-1	2 $\mu$ l
10 $\mu$ M 配列-2	2 $\mu$ l
水	27.5 $\mu$ l
LA Taq <sup>®</sup> リメーゼ	0.5 $\mu$ l
総量	50 $\mu$ l

PCRサイクルは、94℃で2分保持後、98℃で20秒間反応させ、68℃まで-1℃/2秒の速度で冷却し、68℃で3分保持し、更に72℃で10分間保持を30回繰り返して行った。

増幅したDNA断片を、1%アガロースゲル電気泳動で分画し、エチジウムブロマイドで染色した後、紫外光照射して目的とするバンドが増幅されるか否か調べた。

その結果、pTARGETosbhを導入したCHO k 1細胞でのみ、目的のバンドが増幅され、コントロールベクターを導入したCHO k 1細胞では、増幅は確認できなかった。

#### 実施例5 osbh導入CHO k 1のオキシステロール結合活性

実施例3で調製したosbhを導入したCHO k 1細胞と、コントロールベクターを導入したCHO k 1細胞の、それぞれのOS結合活性の比較を行った。

1×10<sup>6</sup>個のosbhを導入したCHO k 1細胞と、コントロールベクターを導入したCHO k 1細胞の細胞質分画をそれぞれ調製し、メンブレンにそれぞれの蛋白質を吸着させた。牛血清アルブミンを含む適切な緩衝液でメンブレンを洗浄後、(<sup>3</sup>H) 放射標識25-ヒドロキシコレステロールあるいは7-ケトコレステロール（アマシャム社製）を含む緩衝液で更に20分反応させた。メンブレン

を洗浄後、取り込まれた放射活性を測定した。その結果、統計学的に有意に、*osbh*を導入したCHO k 1では、コントロール細胞と比較してOS結合活性が高い値を示した。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、OSBPと、本発明であるOSBHとのアミノ酸配列の相同性の比較を示す。

第2図は、*osbh*を用いてin vitroトランスレーション法により発現させたOSBHのSDS-PAGEの結果を示す。

## 請 求 の 範 囲

1. 以下の (a) または (b) の蛋白質 ;
  - (a) 配列番号 : 1 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質 ;
  - (b) 配列番号 : 1 のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換もしくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつオキシステロール結合活性を有する蛋白質。
2. 以下の (a) または (b) のDNA
  - (a) 配列番号 : 2 に記載の塩基配列からなるDNA
  - (b) 配列番号 : 2 のDNAとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつオキシステロール結合活性を有する蛋白質をコードするDNA。



第 1 図

OSBH	10	20	30
	MNGEEFFDA---VT---EΛNQKVTGMIDLDTSKNNRIG		
OSBP	320	330	340
	HLERAFRGATVLPANTPGNVGSGKDQCCSGCKGDMSEDEDEDNEFFDAPEIITMPENLGHKRTGSGNISGASSDISLD	350	360
OSBH	40	50	60
	XTGERPSQENG IQKHRTSLP-APMFSRSDFSVATILKXCVGLELSKITMPIAFNEPLSFLQRI TEYMEHVYL IHR	70	80
OSBP	400	410	420
	EQYKHQLEETXKEK-RTRIPYKPNYS---LNLWSIMKNCIGKELSKIPMPVNFNEPLSMLQRLTEDLEYHELDR	430	440
OSBH	110	120	130
	ASCQPQLERMQSVAAFAVASQWERTGKPFNPLLGETYELIR-EDLGFRFISEQVSHHPPISAFHSEGLNHD	140	150
OSBP	470	480	490
	AAKENSLEQLCYVAAFTYSSYSTTVFRTSKPFNPLLGETFELDRLEENGYSRLCEQVSHHPPAAAAHHAESKN-G	500	510
OSBH	190	200	210
	FLFHCSIYPKLFKFKGCKSVEAEPRGTITLELLKXNEAYTWTNPTCCVHNVIIGKLVIEQYGTVEILNHR TGHKCVL	220	230
OSBP	540	550	560
	WTLRQEIKITSKFRCKYLSIMPLGTIHCIFHATGHHYTWKKKVTTTVHNIIVGKLVIDQSGEIDIVNHKTGDKCNL	570	580
		590	600
			610

第 1 圖

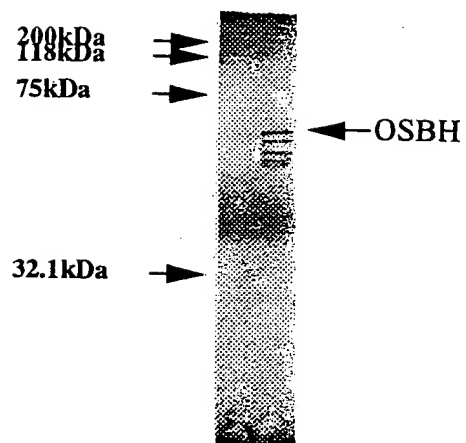
	260	270	280	290	300	310	320	330
OSBH	HFKPCGLFGKEL-HKVEGHIQDKNKKKLFMIYKWTCLWGIDPVSYESFKXQERRGDLRKAKLDEDSGKADSD							
OSBP	KFVPYSYFSRVDVARKYTGVEVTPSGKXVNFALLGTWDEKN-----ECFKVQVPVIG-----ENGCDARQR							

	340	350	360	370	380	390	400
OSBH	VADDYPVAQETVQVIPGSKLLWRINTRPPNSAQMYNFTSFTVSLNELETGMEKTLPTDCRLRPDIRGMENGNMD						
OSBP	GHE-----AEE5-RV-----WLWKRNPPLPKXNAENWYFSELALTLNAWESCTA-----PTDSRLRPDQRLMENGWRWD						
	670	680	690	700	710	720	730

	410	420	430	440	450	460
OSBH	LASQEKERLEEXQREARRR	AKKEAE	-----	WQTRWFYPCGN	PPYTGTPDWLYAGDYFE	---RNFSDCPD
	:	:	:	:	:	:
OSBP	EANA	EQRLEEKQRLSRKXKREAE	AMKATEDG	TPYPYKALWFERKKD	PVTKELTHIYRGEYWECKEKQD	WSSCPD
	740	750	760	770	780	800

OSBH 468  
OSBP 1Y  
IF 1:

第 2 図



## 配 列 表

## S E Q U E N C E   L I S T I N G

&lt;110&gt; TAISHO PHARMACEUTICAL CO., Ltd.

&lt;120&gt; Oxysterol Binding Protein Homolog

&lt;130&gt; P486

&lt;150&gt; JP10-227718

&lt;151&gt; 1998-08-12

&lt;160&gt; 3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 468

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapience

&lt;400&gt; 1

Met	Asn	Gly	Glu	Glu	Glu	Phe	Phe	Asp	Ala	Val	Thr	Glu	Ala	Asn	5	10	15
Gln	Lys	Val	Thr	Gly	Met	Ile	Asp	Leu	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Asn	20	25	30
Arg	Ile	Gly	Lys	Thr	Gly	Glu	Arg	Pro	Ser	Gln	Glu	Asn	Gly	Ile	35	40	45
Gln	Lys	His	Arg	Thr	Ser	Leu	Pro	Ala	Pro	Met	Phe	Ser	Arg	Ser	50	55	60
Asp	Phe	Ser	Val	Trp	Thr	Ile	Leu	Lys	Lys	Cys	Val	Gly	Leu	Glu	65	70	75
Leu	Ser	Lys	Ile	Thr	Met	Pro	Ile	Ala	Phe	Asn	Glu	Pro	Leu	Ser	80	85	90
Phe	Leu	Gln	Arg	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Glu	His	Val	Tyr	Leu	Ile	95	100	105
His	Arg	Ala	Ser	Cys	Gln	Pro	Gln	Pro	Leu	Glu	Arg	Met	Gln	Ser	110	115	120
Val	Ala	Ala	Phe	Ala	Val	Ser	Ala	Val	Ala	Ser	Gln	Trp	Glu	Arg	125	130	135
Thr	Gly	Lys	Pro	Phe	Asn	Pro	Leu	Leu	Gly	Glu	Thr	Tyr	Glu	Leu	140	145	150
Ile	Arg	Glu	Asp	Leu	Gly	Phe	Arg	Phe	Ile	Ser	Glu	Gln	Val	Ser	155	160	165

His His Pro Pro	Ile Ser Ala Phe His	Ser Glu Gly Leu Asn His
	170	175 180
Asp Phe Leu Phe	His Gly Ser Ile Tyr	Pro Lys Leu Lys Phe Trp
	185	190 195
Gly Lys Ser Val	Glu Ala Glu Pro Arg	Gly Thr Ile Thr Leu Glu
	200	205 210
Leu Leu Lys His	Asn Glu Ala Tyr Thr	Trp Thr Asn Pro Thr Cys
	215	220 225
Cys Val His Asn	Val Ile Ile Gly Lys	Leu Trp Ile Glu Gln Tyr
	230	235 240
Gly Thr Val Glu	Ile Leu Asn His Arg	Thr Gly His Lys Cys Val
	245	250 255
Leu His Phe Lys	Pro Cys Gly Leu Phe	Gly Lys Glu Leu His Lys
	260	265 270
Val Glu Gly His	Ile Gln Asp Lys Asn	Lys Lys Lys Leu Phe Met
	275	280 285
Ile Tyr Gly Lys	Trp Thr Glu Cys Leu	Trp Gly Ile Asp Pro Val
	290	295 300
Ser Tyr Glu Ser	Phe Lys Lys Gln Glu	Arg Arg Gly Asp His Leu
	305	310 315
Arg Lys Ala Lys	Leu Asp Glu Asp Ser	Gly Lys Ala Asp Ser Asp
	320	325 330
Val Ala Asp Asp	Val Pro Val Ala Gln	Glu Thr Val Gln Val Ile
	335	340 345
Pro Gly Ser Lys	Leu Leu Trp Arg Ile	Asn Thr Arg Pro Pro Asn
	350	355 360
Ser Ala Gln Met	Tyr Asn Phe Thr Ser	Phe Thr Val Ser Leu Asn
	365	370 375
Glu Leu Glu Thr	Gly Met Glu Lys Thr	Leu Pro Pro Thr Asp Cys
	380	385 390
Arg Leu Arg Pro	Asp Ile Arg Gly Met	Glu Asn Gly Asn Met Asp
	395	400 405
Leu Ala Ser Gln	Glu Lys Glu Arg Leu	Glu Glu Lys Gln Arg Glu
	410	415 420
Ala Arg Arg Glu	Arg Ala Lys Glu Glu	Ala Glu Trp Gln Thr Arg
	425	430 435
Trp Phe Tyr Pro	Gly Asn Asn Pro Tyr	Thr Gly Thr Pro Asp Trp
	440	445 450
Leu Tyr Ala Gly	Asp Tyr Phe Glu Arg	Asn Phe Ser Asp Cys Pro
	455	460 465
Asp Ile Tyr		
468		

&lt;211&gt; 1407

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapience

&lt;400&gt; 2

10	20	30	40	50	60	
atgaacggag	aggaagaatt	ctttgatgcc	gtcacagagg	caaatcagaa	agtcacggga	60
atgattgact	tagacaccag	caaaaataat	aggattggga	aaactgggga	gaggccctct	120
caagagaacg	gaattcagaa	acacaggaca	tcgtgccgg	ctcccatggt	cagcagaagc	180
gatttcagcg	tgtggaccaa	ctgaagaag	tgtgtggcc	tggagctgtc	caagatcacg	240
atgccaatcg	ctttcaacga	gccctcgagc	ttcttgcagc	ggatcacgga	gtacattggag	300
cacgtgtacc	tcatccacag	ggcctccgtc	cagccccagc	ccctggagag	gatgcagtct	360
gtggctgtct	tgtctgtttc	ggctgtggct	tcccagtgga	agaggaccgg	caaaccattt	420
aatccactct	tgggagaaac	gtatgaatta	atcagggaag	atttaggatt	cagatttata	480
tgggaacagg	tcagtcacca	cccccccatc	agtgcgttcc	actcggaagg	tcitcaacat	540
gatttctgt	tccatggctc	catctacccc	aagctcaagt	tctggggcaa	aagcgtggag	600
gcggagcccc	gaggcaccat	cacctggag	ctgtctaaac	ataatgaagc	ctacacctgg	660
accaacccca	ctgtctgcgt	ccacaacgtc	atcatcgga	agctgtggat	agagcagtat	720
gggacagtgg	agattttaaa	ccacagaact	ggacataagt	gtgtgtctta	ctttaaaccg	780
tgtggattat	tggaaaaga	attcacaag	gtggaaggac	acattcaaga	caaaaacaaa	840
aagaagctct	ttatgatcta	tggcaaatgg	acggaatgtt	tgtggggcat	agatccgttt	900
tgtatgaat	ctttcaagaa	gcaggagagg	agaggtagcc	acctgagaaa	ggccaagctg	960
gatgaagact	ccgggaaggc	tgacagcgac	gtggctgacg	acgtgccctg	ggcccaggag	1020
accgtgcagg	tcatctctgg	cagcaagctg	ctctggagga	tcaacacccg	gcccccaaac	1080
ctgtcccaga	tgtataatit	caccagtctc	actgtgagcc	tcaacgagct	ggagacaggc	1140

atggagaaga cccigccacc cacggacigc cgccigcgcc ctagacatccg cggcatggag 1200  
 aaiggcaaca iggatciggc cagccaggag aaggagcggc iggaggagaa gcagagagaa 1260  
 gcacggaggg agcggggccaa ggaggaggca gagtggcaga cgaggtaggt clacccaggc 1320  
 aataacccct acacigggac ccccgactgg ttgtatgcag gggattactt tgagcggaat 1380  
 ttctccgact gccagataat ctactga 1407

<210> 3  
 <211> 3879  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapience

<400> 3

ccgagggacc cgcgtccaga tcttcagigt ctatlggatt ttccaagag aaagttagta 60  
 aaattcctta cactgtagat gggatcaga tacgaigatt cagtagaaga gcacatgtca 120  
 ggggcagtagg aggcctggctg ctgaagg 147

atg aac gga gag gaa gaa ttc ttt gat gcc gtc aca gag gca aat 192  
 Met Asn Gly Glu Glu Glu Phe Phe Asp Ala Val Thr Glu Ala Asn  
 5 10 15  
 cag aaa gtc acg gga atg att gac tta gac acc agc aaa aat aat 237  
 Gln Lys Val Thr Gly Met Ile Asp Leu Asp Thr Ser Lys Asn Asn  
 20 25 30  
 agg att ggg aaa act ggg gag agg ccc tct caa gag aac gga att 282  
 Arg Ile Gly Lys Thr Gly Glu Arg Pro Ser Gln Glu Asn Gly Ile  
 35 40 45  
 cag aaa cac agg aca tcg ctg ccg gct ccc atg ttc agc aga agc 327  
 Gln Lys His Arg Thr Ser Leu Pro Ala Pro Met Phe Ser Arg Ser  
 50 55 60  
 gac ttc agc gtc tgg acc atc ctg aag aag tgt gtt ggc ctg gag 372  
 Asp Phe Ser Val Trp Thr Ile Leu Lys Lys Cys Val Gly Leu Glu  
 65 70 75  
 ctg tcc aag atc acg atg cca atc gcc ttc aac gag cct ctg agc 417  
 Leu Ser Lys Ile Thr Met Pro Ile Ala Phe Asn Glu Pro Leu Ser  
 80 85 90  
 ttc ttg cag cgg atc acg gag tac atg gag cac gtg tac ctg atc 462  
 Phe Leu Gln Arg Ile Thr Glu Tyr Met Glu His Val Tyr Leu Ile  
 95 100 105

cac agg gcc tcc tgc cag ccc cag ccc ctg gag agg atg cag tct	507
His Arg Ala Ser Cys Gln Pro Gln Pro Leu Glu Arg Met Gln Ser	
110 115 120	
gtg gct gct ttt gct gtt tgc gct gtg gct tcc cag tgg gag agg	552
Val Ala Ala Phe Ala Val Ser Ala Val Ala Ser Gln Trp Glu Arg	
125 130 135	
acc ggc aaa cca ttt aat cca ctc ttg gga gaa acg tat gaa tta	597
Thr Gly Lys Pro Phe Asn Pro Leu Leu Gly Glu Thr Tyr Glu Leu	
140 145 150	
atc agg gaa gat tta gga ttc aga ttt ata tgc gaa cag gtc agt	642
Ile Arg Glu Asp Leu Gly Phe Arg Phe Ile Ser Glu Gln Val Ser	
155 160 165	
cac cac ccc ccc atc agt gcg ttc cac tgc gaa ggt ctc aac cat	687
His His Pro Pro Ile Ser Ala Phe His Ser Glu Gly Leu Asn His	
170 175 180	
gac ttc ctg ttc cat ggc tcc atc tac ccc aag ctc aag ttc tgg	732
Asp Phe Leu Phe His Gly Ser Ile Tyr Pro Lys Leu Lys Phe Trp	
185 190 195	
ggc aaa agc gtg gag gcg gag ccc cga ggc acc atc acc ctg gag	777
Gly Lys Ser Val Glu Ala Glu Pro Arg Gly Thr Ile Thr Leu Glu	
200 205 210	
ctg ctc aaa cat aat gaa gcc tac acc tgg acc aac ccc acc tgc	822
Leu Leu Lys His Asn Glu Ala Tyr Thr Trp Thr Asn Pro Thr Cys	
215 220 225	
tgc gtc cac aac gtc atc atc ggg aag ctg tgg ata gag cag tat	867
Cys Val His Asn Val Ile Ile Gly Lys Leu Trp Ile Glu Gln Tyr	
230 235 240	
ggg aca gtg gag att tta aac cac aga act gga cat aag tgt gtg	912
Gly Thr Val Glu Ile Leu Asn His Arg Thr Gly His Lys Cys Val	
245 250 255	
ctt cac ttt aaa ccg tgt gga tta ttt gga aaa gaa ctt cac aag	957
Leu His Phe Lys Pro Cys Gly Leu Phe Gly Lys Glu Leu His Lys	
260 265 270	
gtg gaa gga cac att caa gac aaa aac aaa aag aag ctc ttt atg	1002
Val Glu Gly His Ile Gln Asp Lys Asn Lys Lys Lys Leu Phe Met	
275 280 285	
atc tat ggc aaa tgg acg gaa tgt ttg tgg ggc ata gat cct gtt	1047
Ile Tyr Gly Lys Trp Thr Glu Cys Leu Trp Gly Ile Asp Pro Val	
290 295 300	
tgc tat gaa tcc ttc aag aag cag gag agg aga ggt gac cac ctg	1092
Ser Tyr Glu Ser Phe Lys Lys Gln Glu Arg Arg Gly Asp His Leu	
305 310 315	
aga aag gcc aag ctg gat gaa gac tcc ggg aag gct gac agc gac	1137
Arg Lys Ala Lys Leu Asp Glu Asp Ser Gly Lys Ala Asp Ser Asp	
320 325 330	



gtg gct gac gac gtg cct gtg gcc cag gag acc gtg cag gtc att	1182
Val Ala Asp Asp Val Pro Val Ala Gln Glu Thr Val Gln Val Ile	
335 340 345	
ccf ggc agc aag ctg ctc tgg agg atc aac acc cgg ccc ccc aac	1227
Pro Gly Ser Lys Leu Leu Trp Arg Ile Asn Thr Arg Pro Pro Asn	
350 355 360	
tct gcc cag atg tat aat ttc acc agt ttc act gtg agc ctc aac	1272
Ser Ala Gln Met Tyr Asn Phe Thr Ser Phe Thr Val Ser Leu Asn	
365 370 375	
gag ctg gag aca ggc atg gag aag acc ctg cca ccc acg gac tgc	1317
Glu Leu Glu Thr Gly Met Glu Lys Thr Leu Pro Pro Thr Asp Cys	
380 385 390	
cgc ctg cgc cct gac atc cgc ggc atg gag aat ggc aac atg gat	1362
Arg Leu Arg Pro Asp Ile Arg Gly Met Glu Asn Gly Asn Met Asp	
395 400 405	
ctg gcc agc cag gag aag gag cgg ctg gag gag aag cag aga gaa	1407
Leu Ala Ser Gln Glu Lys Glu Arg Leu Glu Glu Lys Gln Arg Glu	
410 415 420	
gca cgg agg gag cgg gcc aag gag gag gca gag tgg cag acg agg	1452
Ala Arg Arg Glu Arg Ala Lys Glu Glu Ala Glu Trp Gln Thr Arg	
425 430 435	
tgg ttc tac cca ggc aat aac ccc tac act ggg acc ccc gac tgg	1497
Trp Phe Tyr Pro Gly Asn Asn Pro Tyr Thr Gly Thr Pro Asp Trp	
440 445 450	
tig tat gca ggg gat tac ttt gag cgg aat ttc tcc gac tgc cca	1542
Leu Tyr Ala Gly Asp Tyr Phe Glu Arg Asn Phe Ser Asp Cys Pro	
455 460 465	
gat atc tac tga	1554
Asp Ile Tyr	
468	

gggccctggag gggccctgggg cccgggaccg gaggctgacg aggctggact tccctcgagtg 1614

gccattgtga gcctcgtcac agcagaaacc aacttttcta acgactgagt tgcgggagat 1674

agcatcatcc ctgatcaagg atgtaattct aattaactgt tgattgccaa acatttcaact 1734

ctgctgtgcc gtctcttcat aaagcttcac ttgggatcat cgtcttcat t aaggtttcaa 1794

cagggaat t cttcacggcg cccitttatg tggcagaaat cagctggggc ttgttttagct 1854

tccagcacac tctcagtcac agcatgtgta gctaaaggaa gtaatgggaa ggggttcatg 1914

ttctctttat aatgcagtgg caaaaggctc tgaagccct ttaaactcga accagtgggg 1974

gaaagaigga icitgaagci aatccigcag agagittiat agaggccagg gaitgccttc 2034  
taaatiaiga taaaacagaa gigaagagii icagagcaic agaitgagig aaaaglitic 2094  
agaiticigia llllllaaca aicltcaata aiglaaagai lacilliaaa atalliaagi 2154  
taaaactiact lgaatagiat tiigcigaag agcaagatat gcattaatca ccggtittiat 2214  
actigiccaa aigaagcaic cccgigacaa accagagtgg gcagaagcai cgagagcgig 2274  
acaggaaatc ccaagactgc ttccgcctca gaggcgtccc ggctgcgati cgcigccctg 2334  
itigicagiga ggcciggtig tcaccgcaca ccgcgtccgt gtctccaggg ggttcccttc 2394  
ttctcacacg tgcgigtac ccatagcaci ctigtigtic lgttttccc agtaigcaig 2454  
tttaaaatag aagtigacaag aatcacatcc ggtigtigtcc tggggaggg tcagaggcag 2514  
aatctactia cagtggigia attaaagtia tttaaccaa aatagglatg tgtccatctc 2574  
agcattcacc ttatcaagi gactgatttt ttttctttt ctltctttt ttttttttt 2634  
itgagacgga gtttactct tgtgtcccag gctggagtgc aatggcatga tctcggtca 2694  
ccgcaacctc cgcctcccgg gttaagcga ttctcttgc tcagctccc aagtagctgg 2754  
gattacaggc acgcgccacc acgcttggt gattitigiat ttttagtga cagggtttt 2814  
cacatgtig gtcaggctgg tctcaaactc ccgacctcaa gtagtctgcc tgcctcaacc 2874  
tcccaaagt cgtggattac aggcgtgagc cactgcgctt ggccgtgact gattttttt 2934  
catgtagaal tglcaacacg agagatcaca gtggagcact ttgaaagacc gtcggtigtg 2994  
tgcacgcacg cacacactca tgcacacgct gacacgcggt tgcattggagt ccaggttact 3054  
caggccggca ctctgagtg acaggigcca cctgcgtgtg tcttggcgtc cacatcacac 3114  
ctgtgacgga agcacttctg gaagtgaaca ctcttttga aagcttgatt ttgtagcttt 3174  
ggaagctgga agcgatggig ttgggtgccg agtccgtgt catctcggg gcctatgagc 3234  
tccgtaccag ccactcaaaa gtgtctgaac agaaccgctc cgtgactggt agctgggtct 3294  
gaggattcag gattgtggcg ttattcaaag aggagacttt gaaattcccc gatggctgga 3354

atlgggagcc caggigccic lggiggaggg lcaicigccl ticcagactg tgglligaa 3414  
ccggciccll ciccaagaaa ggllgcaagc tagaacaicc agaggigaga ctcagacaca 3474  
tigaaagiga cigcatttag ggagglltaa cgagticlla cigaicatic cactlgtiac 3534  
lgtllaagat aatllgcca cgggllgtll lccaaglccl ctctaggac caggcicclg 3594  
gtatllcagg ggclggllgg ctcacagac agcccciccl ctgcigiccl tgaggacaga 3654  
caccaaacca gaggiggagg aagaacgga ggaaggcga tggcaaaagc ggctgltgt 3714  
cgaggllatt ttaactllll actactllll gttactgtll ctgcaaatgc taacacataa 3774  
accaigacct aactlllgic acctlggata tctatlgaa gttaaacaic tctaataaag 3834  
atggccacca cttaatgtgt ggaaaglgat ggccctcicg tgggc 3879

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04353

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
Genbank/DDBJ/EMBL/Geneseq, JICST (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Takahiro N. et al. "Prediction of the Coding Sequences of Unidentified human Genes. XI. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro." DNA Res. (1998, Nov.) Vol. 5, p.277-286	1-2
Y	Levanon, D. et al. "cDNA Cloning of Human Oxysterol-Binding Protein and Localization of the Gene to Human Chromosome 11 and Mouse Chromosome 19" GENOMICS (1990), Vol. 7, No. 1, p.65-74	1-2
Y	Dawson, P.A. et al. "cDNA cloning and expression of oxysterol-binding protein, an oligomer with a potential leucine zipper" J.Biol.Chem. (1989) Vol. 264, No. 28, p. 16798-16803	1-2
Y	Ohara, O. et al. "Construction and Characterization of Human Brain cDNA Libraries Suitable for Analysis of cDNA Clones Encoding Relatively Large Proteins" DNA Res. (1997) Vol. 4, No. 1, p. 53-59	1-2



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 November, 1999 (08.11.99)

Date of mailing of the international search report

24 November, 1999 (24.11.99)

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04353

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ryuichiro Sato "Intracellular lipid carrier protein" Arteriosclerosis (1996) vol. 24, Nos. 7/8, p. 349-352	1-2

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/04353

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>6</sup> C12N15/12, C07K14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),  
Genbank/DBJ/EMBL/Geneseq, JICSTファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Takahiro N. et al. "Prediction of the Coding Sequences of Unidentified human Genes. XI. The Complete Sequences of 100 New cDNA Clones from Brain Which Code for Large Proteins in vitro." DNA Res. (1998, Nov.) 第5巻 p. 277-286	1-2
Y	Levanon, D. et al. "cDNA Cloning of Human Oxysterol-Binding Protein and Localization of the Gene to Human Chromosome 11 and Mouse Chromosome 19" GENOMICS (1990) 第7巻 第1号 p. 65-74	1-2
Y	Dawson, P. A. et al. "cDNA cloning and expression of oxysterol-binding protein, an oligomer with a potential leucine zipper" J. Biol. Chem. (1989) 第264巻 第28号 p. 16798-16803	1-2

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08. 11. 99

国際調査報告の発送日

24.11.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N 9549

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Ohara, O. et al. "Construction and Characterization of Human Brain cDNA Libraries Suitable for Analysis of cDNA Clones Encoding Relatively Large Proteins" DNA Res. (1997) 第4巻 第1号 p. 53-59	1-2
Y	佐藤隆一郎「細胞内脂質輸送蛋白」動脈硬化 (1996) 第24巻 第7/8号 p. 349-352	1-2



.

.

.

.